

Adenine による大腸菌の増殖抑制機構

障害部位及び作用因子を中心とした adenine の増殖抑制作用

金沢大学医学部第二生化学講座(主任:久野 滋教授)

細 野 隆 次

(昭和47年10月9日受付)

本論文の一部は第43回並びに44回日本生化学会に於いて発表した。

Adenine の静菌的な作用については, *Aerobacter aerogenes* を用いてはじめて報告された^{1) 2)}. この作用は, thiamine の pyrimidine 部分の合成が adenine 添加によって阻害されるためである^{1) 3)}.

Escherichia coli に於いても, adenine 添加によって増殖が抑制されることが報告されている⁴⁾. 然し, *E. coli* では, *A. aerogenes* や *Salmonella typhimurium* と異なって thiamine を添加しても完全には回復しない. 本研究はこのような thiamine 存在下でもひきおこされる adenine による増殖抑制機構を調べる目的で始められた. 得られた結果は, orotic acid から pyrimidine nucleotide に至る経路が阻害されていることを示す. この結果は, Mouse fibroblast で観察された事実と一致する⁵⁾.

材料及び方法

大腸菌株

実験は専ら大腸菌株 *E. coli* w3110 を用いて行われた. Thymine の取り込みは, W3110-201 (thymine auxotroph)⁶⁾ を用いて行なった.

培地

大腸菌はTGA⁷⁾ 培地で培養した. この培地は casamino acid (1g/l), thiamine (0.5mg/l), tryptophan (10mg/l) を含む.

試薬

Adenine 及びATP(興人). ATPを除く nucleotide (Sigma). (5-³H) Uracil, (5-³H) uridine (The Radio Chemical Centre). (U-¹⁴C) Lysine, (2-¹⁴C) adenine, (6-¹⁴C) orotic acid, ³²P-phosphoric acid

(第一化学薬品株式会社).

酸素消費測定

酸素消費は Warburgh 検圧計を用いて測定した. 対数増殖期の菌を集め, glycerol 及び casamino acid を除いたTGA培地(T培地)で2回洗ったのち同じT培地に浮遊し(2×10^8 cells/ml), 使用直前まで氷冷状態で保存する. 主室にこの菌浮遊液(1.6ml)を入れる. 側室に0.05M glucose (0.2ml) 及び adenine (0.2ml), 副室に2N KOH 及び濾紙をそれぞれ入れる. 側室の溶液を主室へ移した後, 37°Cで酸素消費を測定した.

取り込み実験

対数増殖期の菌に放射活性 thymine, uracil, lysine, uridine あるいは orotic acid を加える. 一定時間毎にこの培養液から0.2mlとり Millipore filter を用いて濾過する. 約20mlの温水(約75°C)で洗滌, 乾燥させ, filter に残っている放射活性を Liquid scintillation counter (Nuclear Chicago, Unilux II) で測定した.

Adenine 分解産物の検出

菌に ¹⁴C-adenine を与えた後培地中に現われる放射活性 adenine, inosine, adenosine 及び hypoxanthine は東洋濾紙No 51を用い paper chromatography によって分離した. 溶媒には蒸留水(pH 10)を使用した⁸⁾.

EDTA処理

Orotic acid の取り込みは, 次のようなEDTA処理した菌を用いた. 菌(4×10^8 cells/ml)を2回等量の0.1M Tris (pH8.0) で洗ったのち, 1/10容量の同一緩衝液に浮遊させ, この菌液に終濃度1mMに

Mechanism of Inhibition of Bacterial Growth by Adenine. **Ryuji Hosono**, Department of Biochemistry (II) (Director: Prof. S. Kuno School of Medicine, Kanazawa University)

なる様EDTAを加え37°Cで2分間静置する。これに10倍量のTGA培地を加え、上に述べた取り込み実験に用いた。

¹⁴C-Adenine 由来の Nucleotide 分析

¹⁴C-Adenine の存在下で培養した菌を遠心で集め、5%酢酸(0°C)に浮遊し⁹⁾遠心する。得られた上澄を、予め5%酢酸で平衡化したDowe×50 column(0.7×2cm)にかけ、同じ溶媒で展開して¹⁴C-adenine と nucleotide を分離する。得られた nucleotide は ammonia 水で中和、凍結乾燥によって濃縮したのち二次元 polyethyleneimine thinlayer chromatography (PEI-TLC) を用いて nucleotide を分離する¹⁰⁾。一次展開は 1 M LiCl (10cm) 及び 2.5M LiCl (8cm) の溶媒で行う。Methanol で薄層板を洗滌、乾燥させた後、1 M ammonium acetate-3.5%boric acid (5cm) 及び 2.5M ammonium acetate-3.5%boric acid (13cm) の stepwise 溶媒系で二次展開を行う。

³²P-labelled nucleoside triphosphate 分析

菌は予め約3世代間 [³²P]-orthophosphate (100mci/mmole) の存在下で培養する。この菌を同じ比活性の³²Pと共に各条件下で37°C、10分間培養する。遠心によって集菌後5%酢酸で抽出、pyridine で中和、凍結乾燥で濃縮した後 PEI-TLC を用いて

nucleotide を分離する¹⁰⁾。一次展開は 1 M ammonium acetate-1 N formic acid (5 cm), 2 M ammonium acetate-2 N formic acid (12cm) の stepwise 溶媒系で行なう。Methanol で薄層板を洗滌して塩類を除く。乾燥後 0.15M ammonium sulfate-3.5% boric acid (5 cm), 0.3M ammonium sulfate-3.5% boric acid (12cm) の stepwise 溶媒系で二次展開を行う。目的とする以外の ³²P labeled 物質の分離は autoradiography によって確認した。

結 果

Adenine による増殖抑制

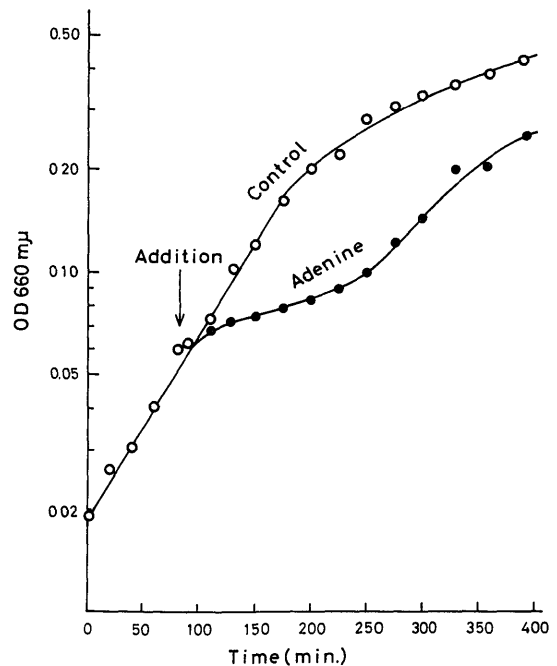
一定濃度以上の adenine を含む培地で大腸菌を培養すると、明らかな増殖抑制が観察される (Fig. 1)。図に示される如くこの抑制効果は永続的ではなく、時間が経つと共に回復する。濁度の代りに colony 形成能で見ても同じ傾向である。この増殖抑制はW3110株に限らず調べた全ての大腸菌で観察された。

塩基及び nucleoside の増殖への影響

塩基及び nucleoside では、adenine が最も強く増殖を抑制する。thymine 及び thymidine にも弱い抑制効果が観察される。これらの抑制効果を

Fig. 1 Effect of adenine on growth of *E. coli*.

The cells were cultured in TGA medium at 37°C aerobically. As indicated by the arrow, adenine (2mM) was added to one culture (●) and equal vol. of water to another (○).



β -galactosidase の誘導的産生を指標として調べると、増殖と同様に adenine によって最も強く抑制されるが、adenosine 及び deoxyadenosine による抑制も著明であり、増殖抑制と多少異なった挙動を示す (Table 1).

Protein, RNA及び DNA 合成に対する adenine の影響

1 mM adenine を含む培地中では、lysine, uracil, thymine の取り込みは30分後では、それぞれ62.5%、55%、58%に抑えられている。従って、

Fig. 2 Effect of adenine on oxygen uptake of E. coli.

The uptake studies were carried out in a atmospheric pressure. The system was allowed to reach at 37°C, and the adenine was tipped into the culture. : no adenine (○), 2mM adenine (●), 8mM adenine (△)

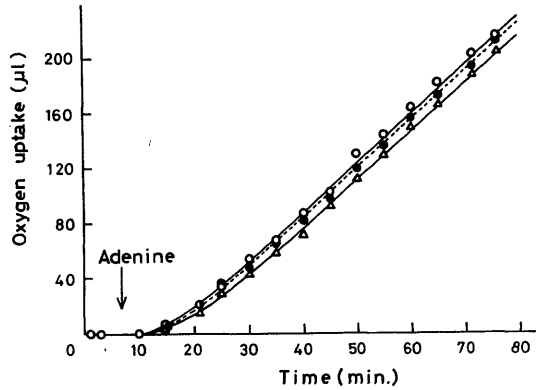


Table1 Effect of bases, nucleosides and deoxynucleosides on growth and on β -galactosidase synthesis

Growth : The indicated amount of sources were added to exponentially growing culture. The effect of the supplements are expressed as increase of the turbidity at first 60 min after the addition.

β -Galactosidase : β -Galactosidase was induced with 5×10^{-4} M IPTG for 30min. Each substance was added with IPTG.

Addition	Rate of growth		β -Galactosidase	
	(mM)	(%)	(mM)	(%)
—	—	100	—	100
Adenine	4	27	1	20
Cytosine	4	100	1	102
Uracil	4	100	1	93
Thymine	4	67	1	88
Adenosine	4	89	1	25
Cytidine	4	92	1	72
Uridine	4	88	1	89
Deoxyadenosine	4	87	1	42
Deoxycytidine	4	97	1	77
Deoxyuridine	4	88	1	100
Thymidine	4	73	1	91

adenine による増殖抑制は Protein, RNA, DNA の何れかが特異的に阻害されることによって生じたものではない。

酸素消費に対する adenine の効果

Adenine を添加すると、大腸菌の energy 産生がどのような影響を受けるかについて、酸素消費の面から検討した。あらかじめ培養した菌を Warburgh flask に入れておく。零時間に glucose と共に adenine を加え酸素消費を測定する。Fig. 2 に示される如く、高濃度の adenine によっても大腸菌の酸素消費は全く影響されない。従ってこの抑制は、呼

吸阻害によってもたらされるのではない。

Adenine と nucleoside 共存化での大腸菌の増殖 前述の如く、nucleoside 単独では大腸菌の増殖はほとんど抑制されない。ところが adenine と nucleoside が共存すると adenine 単独の場合とは異なった効果があることが判明した。即ち adenine と共に、adenosine を加えると、adenine 単独の場合より強い増殖抑制が生ずる (Fig. 3 a)。Guanosine あるいは inosine を共存させた場合も同様な効果がある。adenine あるいは inosine のこのような効果については既に報告されている¹⁾。こ

Fig. 3 Effect of adenine on cell growth in the presence of uridine or adenosine. Cells were cultured as described in Fig. 1.

- a) ○, No addition; △, adenosine (0.1mM); ●, adenine (2mM); ▲, adenine (2mM) + adenosine (0.1mM)
- b) ○, No addition; △, adenine (2mM) + uridine (0.1mM); ●, adenine (2mM)

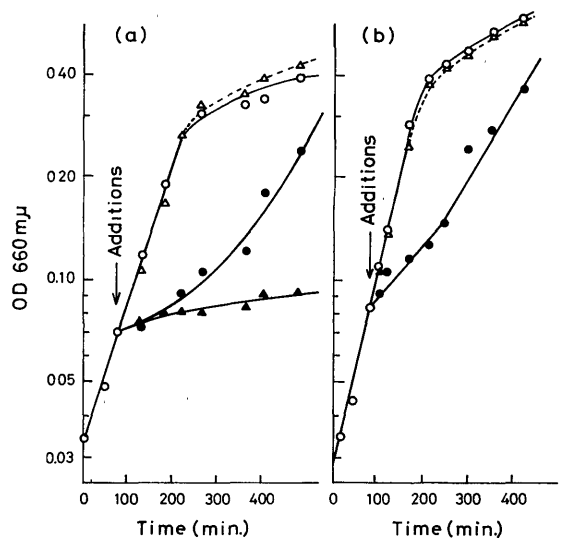
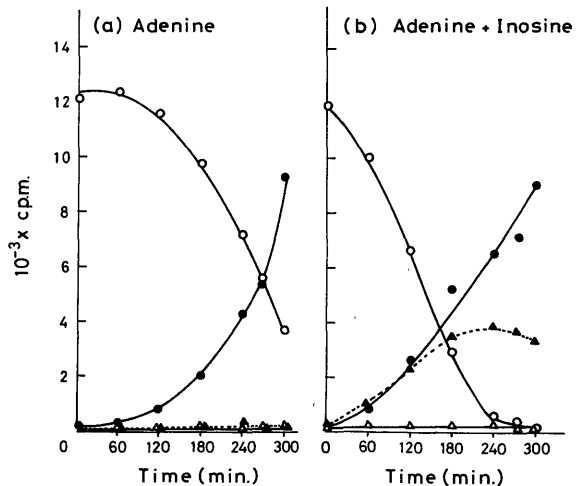


Fig. 4 Degradation of adenine (1).

Cells were grown with : (a) [8-¹⁴C] adenine (0.5mM, 0.65mCi/mmole) or (b) [8-¹⁴C] adenine (0.5mM, 0.65mCi/mmole) plus inosine (0.1mM). The radioactivity appeared in medium was assayed chromatographically. ○, Adenine; ●, hypoxanthine; △, adenosine; ▲, inosine



れに反して adenine に uridine を共存させると、adenine による増殖抑制はほとんど打ち消される (Fig. 3b). Cytidine にも同じ効果が観察された。以上の如く、adenine に purine nucleoside が共存すると、adenine 単独の場合より強い増殖抑制がおり、逆に pyrimidine nucleoside が共存すると adenine による増殖抑制効果は弱まる。

Adenine の分解

Fig. 4 aは放射活性 adenine の分解を経時的に調べた結果である。adenine は最終的には hypoxanthine になる。Hypoxanthine は全く大腸菌の増殖を抑制しないだけでなく部分的に adenine による増殖抑制を解除する。前述の如く adenine + inosine では adenine 単独の場合より急速に分解

Fig. 5 Degradation of adenine (2).
Experimental procedure is same as in Fig.4 except uridine is used instead of inosine. The mark shown in the figure is same as Fig.4.

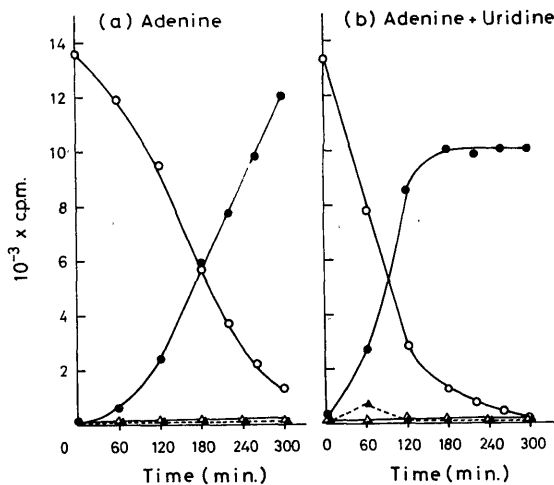


Table 2 Purine nucleotides derived from adenine
Bacteria (1.3×10^8 cells/ml) were grown with ($2\text{-}^{14}\text{C}$) adenine ($55\mu\text{M}$, $22\text{mCi}/\text{mmoles}$) or ^{14}C -adenine plus uridine (0.1mM) for 10min. ^{14}C -labelled culture samples of 6 ml were collected by centrifugation, extracted and chromatographed as described in Experimental Procedures.

		Adenine	Adenine+Uridine
Ribonucleotides	AMP	22 cpm	42 cpm
	GMP	128	138
	IMP	144	366
	ADP	2151	1286
	ATP	4775	1981
	GTP	653	967
Deoxyribo-nucleotides	dAMP	18	85
	dGMP	4	26
	dATP	179	181
	dGTP	—	95

される (Fig. 4 b). このような急速な分解は adenine+uridine のような増殖抑制が解除されるような条件下でも観察される (Fig. 5 b). 従って adenine の分解産物又は分解過程が増殖抑制の直接の原因ではない。

Adenine 由来の purine nucleotide

次に adenine から nucleotide への転換について考察した。Table 2 に示される如く、adenine 由来の nucleotide のうち大部分が ATP 及び ADP として存在する。adenine+inosine の条件下でも ATP+ADP の level は高くなる (data は記述されていない)。これに対して、adenine+uridine の条件下では ATP+ADP の level は adenine 単独の場合のほぼ半分低下する。

Pyrimidine nucleotide 合成に対する adenine の影響

前述の如く、adenine+uridine の条件下では増殖抑制はほとんど認められない。また uridine の取り込みは adenine によってほとんど抑えられない (Fig. 6). 次に orotic acid の取り込みに対する adenine の影響について調べた。orotic acid は正常状態の大腸菌にはほとんど取り込まれない。そこで短い時間温和な条件で EDTA 処理した大腸菌を用いた。図に示される如く (Fig. 7), orotic acid

の取り込みは adenine によって抑えられる。adenine+uridine のような大腸菌の増殖が抑えられないような条件下でも、orotic acid の取り込みは依然として抑えられている。

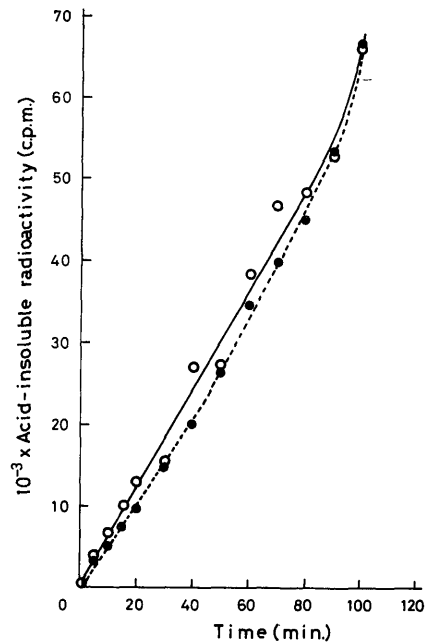
以上の結果より、adenine 添加によって orotic acid から pyrimidine nucleotide に至る経路が阻害されていることは明らかである。Uridine によって adenine による増殖抑制が回復するのは、阻害された pyrimidine nucleotide の合成が uridine によって補われるからであろう。この可能性を検討するため、次に菌体内の nucleoside triphosphate level が adenine 添加によってどのような影響をうけるか調べた。

Nucleoside triphosphate level

Table 3 は adenine あるいは adenine+uridine の条件下での nucleoside triphosphate の level を測定した結果である。adenine を添加すると CTP 及び UTP の level は control のそれぞれ $1/4$ 及び $1/10$ に低下する。これに対し adenine+uridine の存在下では、CTP も UTP も control の level まで回復する。この結果は、adenine 添加によって pyrimidine nucleotide の合成が阻害されるという、上の考えを支持する。一方 adenine 添加によって ATP の level は

Fig. 6 Effect of adenine on the incorporation of uridine.

A exponential culture (1.0×10^8 cells/ml) were suspended in medium containing ($5\text{-}^3\text{H}$) uridine ($274\text{mCi}/\text{mmoles}$, 0.1mM) (○) or containing the radioactive uridine and adenine (2mM) (●). Sample volumes were 0.2ml .



control の 2 倍に増加するが, adenine+uridine の条件下でも ATP の level は依然として高い. 従って ATP の level が高いことそれ自身は大腸菌に対し直接の毒性をもたらさない.

考 察

Adenine 添加によってひきおこされる静菌的作用については, これまで pyrimidine 合成から分枝する thiamine の合成が阻害されるためであると考え

Fig. 7 Incorporation of [6-¹⁴C] orotic acid into acid insoluble fractions. EDTA treated cells (2 × 10⁸ cells/ml) were suspended in medium containing [6-¹⁴C] orotic acid (6.87mCi/mmoles, 0.5mM) in the presence of : (1) no addition (=control) ; (2) adenine (2mM); (3) uridine (0.1mM); (4) adenine (2mM)+ uridine (0.1mM). Sample volumes were 0.2ml.

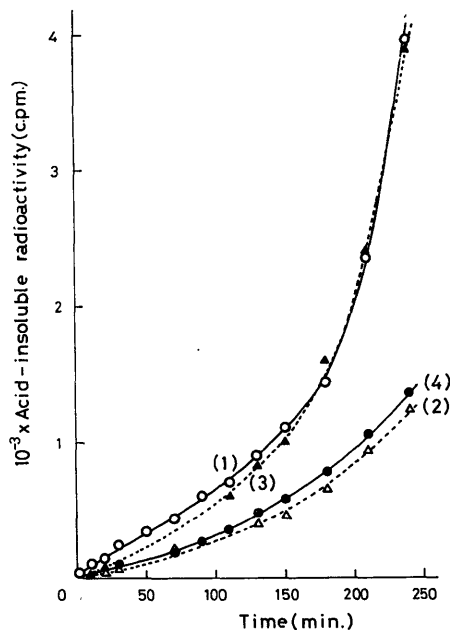


Table 3 Levels of nucleoside triphosphates in bacteria with adenine or adenine plus uridine

Cells (1 × 10⁸ cells/ml), prelabelled with ³²P-orthophosphate (100mCi/mmoles), were cultured with the same specific activity of ³²P in TGA medium containing adenine (2 mM) or adenine (2 mM)+uridine (0.1mM)

NTP	Nanomoles of NTP/OD at 660 μ/ml of culture		
	Control	Adenine	Adenine+Uridine
ATP	0.824	1.961	2.020
GTP	0.256	0.202	0.275
CTP	0.513	0.121	0.472
UTP	0.201	0.018	0.170
dATP	0.090	0.152	0.134
dGTP	0.036	0.021	0.031
dCTP	0.059	0.044	0.107
TTP	0.047	0.021	0.107

られていた^{1)~3)}。上に得られた結果は、大腸菌では thiamine 合成以外に pyrimidine nucleotide の合成が阻害されることを示している。Table 1 に示される如く、adenine はまた β -galactosidase の誘導的合成を強く阻害する。一般に静菌的作用を持つ物質は誘導的酵素合成を強く阻害することが知られているが、塩基及び nucleoside による静菌的作用と β -galactosidase の誘導的合成の阻害との間には必ずしも対応関係は認められない。

Adenine による増殖抑制は、adenine 自身によるものであるとは考え難い。その理由として、(1) adenine と共に adenosine を加えた場合、増殖は強く抑制されるにも拘らず、adenine は単独で加えた場合より急速に分解される。(2) adenine phosphoribosyl transferase (2. 4. 2. 7) を欠く菌では adenine による増殖抑制が認められない¹¹⁾、等が上げられる。Adenine の大部分は最終的には hypoxanthine に変わるが、hypoxanthine には全く増殖抑制効果がない。またこの分解過程で現われる adenosine, inosine も効果がない。従って、adenine 添加による増殖抑制は、adenine 又はその分解産物によるものとは考え難い。¹⁴C-Adenine を用いた nucleotide 分析の結果は、かなりの adenine が nucleotide 特に ATP 及び ADP として蓄積されることを示している。このような nucleotide level の異常な上昇が増殖抑制の原因となっているのかも知れない。Mouse 胚の fibroblast の培養細胞に高濃度の AMP や ATP を与えると細胞が死んだり異常形態を呈する¹²⁾。細菌ではまだこのような報告はないが、上の結果はこの可能性を支持する。あるいは、adenine 由来の nucleotide が直接の作用因子として働らくのではなく、adenine が nucleotide に変わる際 PRPP を消費するが、そのため一時的に菌体内の PRPP 量が低下することが原因となっているのかも知れない。事実 Ehrlich 腹水癌細胞を用いて培地中に adenine を加えると細胞内の PRPP 量が著しく減少することが知られている¹³⁾。Adenine を添加すると pyrimidine nucleoside triphosphate の level は顕著に低下する。このことから、pyrimidine nucleotide の合成が阻害されていることは明らかである。Orotic acid のとりこみが adenine によって阻害されることから、この阻害の場所は、Orotic acid から UMP に至る経路であると推定される。従って orotate phosphoribosyltransferase (2. 4. 2. 10) か orotidylic acid decarboxylase (4. 11. 23)

の何れかの反応の阻害と考えられる。Mouse fibroblast に於ける adenine による蛋白合成阻害は、本稿の E. coli の場合と類似しているが、この阻害は OMP によって部分的に回復する⁵⁾。このことから orotate phosphoribosyltransferase の阻害が最も可能性があろう。この阻害がどのような機作で行われているかについては現在推論の域を出ないが、次の2つの機構が考えられよう。一つは adenine 添加によって生じた細胞内の adenine nucleotide 特に ATP 又は ADP の pool の著しい増加が orotate phosphoribosyltransferase 活性を阻害する場合で、rat liver の本酵素は in vitro で或る濃度以上の ATP により阻害されることが知られている¹⁴⁾。第二は orotate phosphoribosyltransferase の基質の一つである PRPP が上述の様に adenine 存在下で著しく減少する為反応が十分行われない場合である。事実 adenine による増殖抑制が uridine によってのみ回復され uracil は全く無効であることはこの考えを支持する。しかし tryptophan 又は histidine 等はその合成に PRPP が関与するが、adenine 存在下で特にこれ等の amino acid の要求性が現われることはない。adenine nucleotide による酵素反応の阻害及び菌体内の PRPP 量の変動については目下検討中である。

要 旨

大腸菌の培養に際して、adenine を培地中に加えると増殖が抑制される。この増殖抑制に伴って DNA, RNA 及び蛋白の生合成は何れも阻害されるが特異的選択的な阻害は認められない。呼吸阻害は全く認められない。Adenine と共に uridine を加えると増殖抑制は解除される。これに対して adenosine を共存させると、更に著明な抑制が観察される。この抑制作用を検討し、次のような結果が得られた。

1. Adenine を添加すると ATP 及び ADP の level が高まる。逆に pyrimidine nucleoside triphosphate の level は低下する。
2. Adenine と共に uridine を加えると pyrimidine nucleotide の level は正常値に近づく。
3. Pyrimidine nucleotide 生合成系、特に orotic acid から pyrimidine nucleotide に至る反応が adenine 添加によって阻害される。
4. Adenine 添加によって、uridine のとりこみは阻害されない。

以上の結果から, adenine 添加による増殖抑制は adenine が nucleotide に変わることによって菌体内の pyrimidine nucleotide の合成が低下するためと考えられる。

謝辞: 本研究に対し, 御指導賜りました久野滋教授はじめ教室員各位に対し深く感謝致します。

文 献

- 1) Moyed, H. S., : J. Bacteriol., **88**, 1024 (1964).
- 2) Brooke, N. S., & Magasanik, B., : J. Bacteriol., **68**, 727 (1954).
- 3) Newell, P. C., & Tucker, R. G., : Biochem. J., **106**, 279 (1968).
- 4) Remy, C. N., & Love, S. H., : J. Bacteriol., **96**, 76 (1968).
- 5) Aronow, L., : Biochem. Biophys. Acta., **47**, 184 (1961).
- 6) Okada, T., Torii, H., & Kuno, S., : Japan. J. Genetics, **44**, 193 (1969).
- 7) Kaempfer, R. O. R., & Magasanik, B., : J. Mol. Biol., **27**, 453 (1967).
- 8) Chargaff, E., & Davidson, J. N., : The Nucleic Acids I, Academic Press
- 9) Munch-Peterson, A., : Eur. J. Biochem., **15**, 191 (1970).
- 10) Neuhard, J., : Biochem. Biophys. Acta., **129**, 104 (1966).
- 11) Benson, C. E., Love, S. H., & Remy, C. N., : J. Bacteriol., **101**, 872 (1970).
- 12) Johnson, G. S., Friedman, R. M., & Pastan, I., : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 425 (1971).
- 13) Henderson, J. F., & Khoo, M. K. Y., : J. Biol. Chem., **240**, 2358 (1965).
- 14) Blair, D. G. R., Stone, J. E., & Potter V. R., : J. Biol. Chem., **235**, 2379 (1960).

Abstract

- 1) The growth of *E. coli* W3110 is inhibited by an addition of adenine to the medium. Although the synthesis of DNA, RNA and protein is also coordinately inhibited by adenine, neither of them is inhibited specifically.
- 2) The growth inhibition due to adenine is overcome by uridine and becomes more prominent in the presence of adenosine, inosine or guanosine.
- 3) In the presence of adenine, the pool size of ATP is elevated, whereas those of CTP and UTP are markedly reduced.
- 4) Restoration of pyrimidine nucleotide pools to normal levels occurs when uridine is added together with adenine.
- 5) The incorporation of orotic acid into nucleic acid is inhibited, while the incorporation of uridine is scarcely inhibited by adenine.
- 6) These results suggest that the growth inhibition provoked by adenine is attributed to the inhibition of the de novo synthesis of pyrimidine nucleotide.